Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Neukölln, Berlin-Buckow II.
Aerztl. Direktor: Prof. Dr. med. K. Holldack

Mitosephasenablauf im Sternalmark akuter Leukaemien

eine vergleichende Untersuchung zur normalen Granulopoese

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Olaf Ganssen
aus Eberswalde

1962

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen
Krankenhauses Neukölln, Berlin-Buckow II.
Aerztl. Direktor: Prof. Dr. med. K. Holldack

MITOSEPHASENABLAUF IM STERNALMARK AKUTER LEUKAEMIEN

EINE VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG ZUR NORMALEN GRANULOPOESE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Olaf Ganssen
aus Eberswalde

Dekan:	Prof. Dr. med., Dr. med. dent. Ewald Harndt
Referent:	Prof. Dr. med. Klaus Holldack
Korreferent:	Prof. Dr. med. Willy Schwarz

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12. 3. 1962

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Fragestellung	5
II.	Material und Methode	9
III.	Ergebnisse	11
IV.	Diskussion	23
V.	Zusammenfassung	28
VI.	Literatur	29

I. Fragestellung

Die Pathogenese der akuten Leukämie steht seit Jahrzehnten im Mittelpunkt wissenschaftlicher Diskussionen. Neben den beiden rivalisierenden Ansichten: hyperplastische Systemerkrankung (EHRLICH, MORAWITZ, ZIEGLER, NAEGELI, FIESCHI) bzw. maligner Blutzelltumor (BANTI, RIBBERT, STERNBERG, ROHR u.v.a.), wurde auch eine infektiöse Aetiologie in Erwägung gezogen. Da klinisch immer wieder Übergänge von Agranulocytosen, Aleukien und Pancytopenien zu akuten Leukämien beschrieben werden, faßte z.B. HOFF, um die gemeinsame Grundstörung zu verdeutlichen, alle diese Erkrankungen unter dem Begriff "Myeloische Insuffizienz" zusammen. Hier wird die akute Leukämie als mißlungener Heilungsvorgang angesehen.

Die je nach Theorie als metaplastisch oder metastatisch bezeichneten myeloischen Wucherungen in den extramedullären Organen, vor allem in Milz und Leber, sowie das dicht mit Zellen vollgepfropfte Knochenmark mit oder ohne Ausschwemmung ins periphere Blut, stehen scheinbar im offenen Widerspruch zum allgemein normal befundeten Mitoseindex. ROHR gibt eine kurze tabellarische Zusammenstellung durchschnittlicher Mitoseindices beim Gesunden und einigen Blutkrankheiten. Sie sei hier wiedergegeben, weil er den größten Überblick auf diesem Gebiet besitzt:

Mitoseindices (abgewandelt nach ROHR)

	Granuloblasten in ‰
Normal	6 - 11
Agranulocytose	5 - 10
Chron. Myelose	8
Akute Myelose	8 - 12

Der Mitoseindex ist bekanntlich direkt proportional der Mitosedauer und der Häufigkeit des Mitoseeintritts. Die Zahlen beziehen sich

nur auf die mitosefähigen Zellen des Sternalmarkes, d.h. Myeloblasten bis Metamyelocyten. Es fällt eine eigenartige Konstanz des granuloblastischen Index' auf, wobei häufig keinerlei Beziehung zwischen Zellhyperplasie und Anstieg der Mitosezahl besteht. FIESCHI entnimmt daraus eine zeitliche Änderung des Zellteilungsablaufes, d.h. eine Verkürzung seiner Dauer. Auch ROHR schließt diese Möglichkeit nicht aus. Das Handbuch der gesamten Hämatologie, Band I, 1957, gibt folgende Auskunft (WEICKER): "Ist innerhalb eines Zellsystems nicht nur die Teilungsfolge sondern auch der Teilungsablauf beschleunigt, so kann trotz erhöhter Teilungsaktivität der Mitoseprozentsatz relativ niedrig sein. Ein gutes Beispiel für diese Diskrepanz ist die akute Leukose, bei der selbst bei nachweisbar stärkster Proliferation der Mitoseprozentsatz sehr niedrig zu bleiben pflegt".

Diese weit verbreitete Auffassung ist nicht unwidersprochen geblieben. Mit Hilfe des durch DUSTIN eingeführten Mitoseblockers Colchicin entwickelten ASTALDI u. MAURI ihren sog. stathmokinetischen Test an in-vitro-Kulturen von Knochenmark. Diese Substanz hemmt sämtliche in einer gewissen Zeitspanne ablaufenden Zellteilungen im Stadium der Praemetaphase. Bei in regelmäßigen zeitlichen Abständen vorgenommenen Zählungen steigt der Index als Funktion der Anzahl der in Mitose eintretenden Zellen. Die Steilheit des Kurvenanstieges ist nur abhängig von der Interkineselänge, die Kinesedauer bleibt ohne jeden Einfluß (BOLL). Die Methode erlaubt, die Intensität der proliferativen Tätigkeit der verschiedenen Zellentwicklungsreihen zu erforschen. In vergleichenden Untersuchungen mit gesunden Personen fanden diese Autoren die Mitosehäufigkeit im Sternalpunktat akuter Leukosen erheblich reduziert und beurteilten daher deren niedrigen oder höchstens normalen Mitoseindex nicht als Folge einer verkürzten Teilungsdauer sondern schlossen auf eine stark verlängerte intermitotische Periode mit einer Reifungshemmung. SALERA und TAMBURINO kamen mit dem stathmokinetischen Test ebenfalls zum Ergebnis einer deutlich abgeschwächten Proliferationsfä-

higkeit akut leukämischer Blasten. Erstaunlicherweise berechneten sie aber deren mittlere Mitosedauer als verkürzt (mit großen Schwankungen) gegenüber den Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten, sowohl der chronischen Leukämie als auch dem gesunden Mark. Der von ASTALDI angegebene auf einer ähnlichen Methode beruhende chronomitotische Test ist unseres Wissens auf akute Leukämien noch nicht angewendet worden.

Ein anderer Weg zum Studium der Zellkinetik des Knochenmarks basiert auf der jetzt von allen Forschern anerkannten Voraussetzung, daß die Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Synthese in den Zellkernen speziell zur Vorbereitung der Mitose abläuft. TAMBURINO und SALERA bestimmten mit Hilfe der Cytoautoradiographie die Aufnahme von P^{32} in die DNS. LAJTHA bediente sich ebenfalls des P^{32} und des mit C^{14} markierten Adenins. Als spezifischster Baustein der DNS wurde in den letzten Jahren zunehmend Tritium-markiertes Thymidin angewandt (FLIEDNER; GAVOSTO und Mitarb.). Alle Autoren geben übereinstimmend an, nach in vivo- oder in vitro-Applikation dieser Substanzen bei der akuten Leukämie einen signifikant schwächeren Einbau in die Zellkerne registriert zu haben; das weise auf eine deutlich herabgesetzte Proliferationsaktivität hin.

Jene Ergebnisse befinden sich in guter Übereinstimmung mit denen des stathmokinetischen Testes, stehen aber im Gegensatz zur herrschenden Schulmeinung. Mit keiner dieser beiden Methoden sind aber bindende Schlüsse über eine Veränderung der Mitosedauer zu erhalten.

Als Beitrag zur umfassenderen Frage der Zellkinetik bei akuten Leukosen wurde daher versucht, eine genauere Aussage über den zeitlichen Teilungsablauf in den Knochenmarkszellen zu machen. Dazu erschien die Lebendbeobachtung menschlichen Sternalpunktates über in vitro-Kulturen am geeignetsten, da sie die direkteste Methode für eine Beurteilung darstellt (BUSSI, BOLL u. RONDANELLI). Sie bietet die

Möglichkeit, optisch Vitalvorgänge an Zellen zu verfolgen, die unter weitgehender Erhaltung ihrer physiologischen Lebensbedingungen für beschränkte Zeit lebensfähig bleiben. Für längere Beobachtungszeiten, wie hierbei erforderlich, erwiesen sich Kulturen geeigneter als Nativpräparate, die nach einer Stunde schon abgestorben sind. Um das grundsätzliche Problem, in vitro gewonnene Ergebnisse zu verabsolutieren und auf in vivo-Verhältnisse zu übertragen, möglichst zu umgehen, wurden eine Reihe von Mitosen aus normalem Knochenmark unter denselben Bedingungen zur vergleichenden Beobachtung herangezogen.

II. Material und Methode

Es kamen die Sternalpunktate von 8 Patienten mit klinisch und hämatologisch gesicherten akuten Leukosen verschiedensten morphologischen Typs zur Beobachtung, dazu die von 6 Vergleichspersonen ohne Erkrankungen des granulopoetischen Systems.

Zur Überlebenderhaltung des Markgewebes wurde in Anlehnung an die Deckglasmethode CARRELs ein vereinfachtes Verfahren nach BOLL angewendet:

Den Kranken wurde zur Gewinnung von Serum und Nativplasma morgens nüchtern Blut abgenommen, das man im sterilen und silikonierten Zentrifugenglas bei 6°C bis zur Verarbeitung aufbewahrte. Die Sternalpunktion schloß sich jeweils frühestens 1 Std. später während der Vormittagsstunden an. Das geförderte Mark wurde in einer physiologischen Salzlösung [+)] aufgefangen, die 0,3 mg% Heparin enthielt. 4 Teile Blutplasma des Patienten wurden nun mit 1 Teil Hühnerembryonalextrakt und 5 Teilen HANKs-Lösung zu einem Kulturmilieu mit der PASTEUR-Pipette gut durchmischt. Von diesem Medium wurden wenige Tropfen auf Deckgläser gesetzt; sie gerannen nach wenigen Minuten. Auf das Koagulum kam ein winziges Knochenmarksbröckchen mit einem kleinen Tropfen Serum. Verschlossen wurde dieser Ansatz mit einem aufgelegten 4 mm dicken Hohlschliffobjektträger und der Rand mit flüssigem Hartparaffin luftdicht abgeschlossen. Die Kulturen kamen darauf umgedreht als hängende Tropfen zur Aufbewahrung bei 37°C in den Brutschrank.

+) sog. HANKs-Lösung: NaCl 8,0, KCl 0,4, $CaCl_2$ (anhydricus) 0,14
$MgSO_4 7H_2O$ 0,2, KH_2PO_4 0,06
$Na_2HPO_4 2H_2O$ 0,06, Glucose 1,0
Phenolrot 0,02, $NaHCO_3$ 0,35
Aqua bidest. ad 1000,0

Für die Beobachtung unter dem Phasenkontrastmikroskop mußten die Zellen nach 12 bis 36 Stunden auf die "platte Kultur" nach BOLL umgesetzt werden. Dafür wurde auf üblichen Objektträgern ein Koagulum aus dem oben beschriebenen Medium flach ausgezogen, die Zellen möglichst fein verteilt und ein Deckglas darauf gesetzt. Die Kultur mußte durch einen abschließenden Paraffinrand wiederum vor Austrocknung geschützt werden. Je flacher der Ausstrich, desto besser war der optische Kontrast. Da die Lebensvorgänge der Zellen direkt nach der Punktion, wohl durch den traumatischen Schock, ins Stocken geraten, erwies es sich als nützlich, den Umweg über eine ca. 24-stündige Bebrütungsdauer zu gehen, während der sich die Zellen erholen können (BOLL).

Beobachtet wurde in einem Mikroskopwärmeschrank bei 37°C mit einer 40fachen Phasenkontrastoptik (ZEISS), und die Ergebnisse auf 16 mm Schwarzweißfilm von einer Aufsetzkamera (Bolex H 16 ohne Objektiv) mit der Zeitraffereinrichtung der Fa. Kindervater festgehalten; Expositionszeit 0,5 sec, Niedervoltlampe 8 V. Gleichzeitig wurden alle Vorgänge registriert und die Zeiten der einzelnen Mitosephasen gestoppt.

In beiden Untersuchungsgruppen wurde außerdem

1) der Mitoseindex auf 1000 Granuloblasten ausgezählt,

2) karyologische Kurven nach FIESCHI, abgewandelt nach BOLL (Ausstellung Rom 1958) aufgestellt, wozu 100 Mitosen pro Patient differenziert wurden.

III. Ergebnisse

Nach Bereitung der oben geschilderten Kulturen wurden die Sternalpunktate beider Versuchsgruppen innerhalb der ersten 48 Stunden durchgemustert, wobei im gleichen Präparat 1 bis maximal 3 Zellteilungen verfolgt werden konnten. Eine Ausnahme bildete eine Kontrollperson, die klinisch eine Markhemmung bot: hier waren eine ganze Reihe Mitosen zu sehen. Anscheinend führte das Umsetzen auf Kulturmilieu zu einer "Enthemmung" der Proliferation.

Die Kriterien für die Abgrenzung der einzelnen Mitosephasen wurden von BOLL übernommen, um ihre Arbeit: "Granuloblastenmitosen" vergleichend mit heranziehen zu können:

1) Prophase oder festes Spirem mit Auflösung der Kernmembran und des Nucleolus.
2) Frühe Metaphase oder lockeres Spirem unter wahlloser Verstreuung der Chromosomen über die Zelle.
3) Späte Metaphase; Anordnung als Monaster bzw. Aequatorialplatte und ihre Verdopplung.
4) Anaphase oder Diaster; Auseinanderweichen der formierten Chromosomen zu den Spindelpolen.
5) Telophase oder lockeres Dispirem; Durchschnürung des Zellplasmas.
6) Rekonstruktionsphase oder festes Dispirem; bis zur Wiederausbildung der Ruhekerne mit Kernmembran.

Im Unterschied zu vielen anderen Autoren beschreibt BOLL in ihrem Schema eine Rekonstruktionsphase. Eine Zellteilung kann erst dann als vollständig abgeschlossen gelten, wenn der Ruhekern wieder sichtbar wird. Diese vom gefärbten Knochenmarkausstrich abgeleitete Einteilung ist auch auf die Lebendbeobachtung anwendbar. Sie bedarf hier jedoch einiger Erläuterungen, entsprechend der dynamischen Betrachtungsweise:

So leicht sich die Prophase im fixierten Präparat diagnostizieren ließ, so schwer war es, sie phasenkontrastmikroskopisch zu erkennen

und ihren Anfang festzulegen. Das hing wohl einerseits mit der relativen Kürze dieser Eröffnungsphase zusammen, andererseits vollzog sich der Übergang vom Ruhekern zum festen Spirem mit der allmählichen Auflösung der Kernmembran so schleichend, daß der genaue Zeitpunkt des Mitosebeginns nicht sicher anzugeben war. Die allermeisten Zellen wurden daher erst im Verlaufe der frühen bzw. späten Metaphase entdeckt, beides längere und für das Auge markantere Abschnitte im Teilungsgeschehen. Des öfteren war zu beobachten, wie die frühe Metaphase mit ihren ungeordnet verstreuten Chromosomen mehrmals mit dem Bilde des Monasters, also der späten Metaphase, abwechselte, bevor diese sich endgültig durchsetzte. In diesen Fällen konnten beide Phasen nicht zeitlich getrennt werden. Aus diesem Grunde wurde bei den Tabellen und Kurven, die einen Vergleich zu den ausgezählten Phasenprozenten aufzeigen sollen, frühe und späte Metaphase zusammengefaßt.

Ein auffallender Unterschied zeigte sich während der Anaphase: das fixierte Präparat bot meist das übliche Aussehen eines Diasters im sich bereits streckenden Zelleib (Abb. 1a); die räumlich aufgebaute Zelle wird nämlich beim Ausstreichen gleichsam "plattgewalzt" und ihre

Abb. 1 a

Abb. 1 b

Abb. 1 c

stark schematisiert; Erklärung siehe Text.

Innenstruktur ebenfalls flach ausgebreitet. Bei der Vitalbeobachtung aber wichen die verdoppelten Chromosomensätze stets in Form der Aequatorialplatten auseinander (Abb. 1b), denn die flache Kammer ließ eine Trennung der Tochterzellen nur in der Objektträgerebene zu, d. h. senkrecht zur Beobachtungsrichtung. Daher bekam man die beiden kranzähnlichen Monaster während ihres Auseinanderrückens zum gleichseiti-

gen Spindelpol nur strichförmig von der Seite zu sehen. Mitunter kippten sie parallel zueinander um wenige Grade nach der einen oder anderen Seite, so daß sich zwei schmale Ellipsen abzeichneten (Abb. 1 c).

Analog zur Prophase war es schwierig, die Kernrekonstruktion zu beurteilen; ihr zeitlicher Abschluß konnte jedoch in allen Mitosen festgelegt werden. - Im Gegensatz zu den Kontrollfällen fiel auf, wie plump und vergröbert sich die Chromosomenfiguren der Leukämiezellen im relativ spärlichen Cytoplasma oft darstellten. - Als interessanter Nebenbefund sei die Bildung einer zweikernigen Zelle erwähnt: wenige Minuten nach Abschluß der Telophase, noch vor Rekonstruktion der Kerne, vereinigten sich die beiden Tochterzellen. BOLL und RONDANELLI beschrieben das gleiche Phänomen. Amitotische Teilungen wurden nicht gesehen.

In den Leukämie-Kulturen aller Patienten wurden zusammen mehr als 10 000 "Blasten" durchgemustert. Verwechselt werden konnten sie höchstens mit Proerythroblasten. Abgesehen davon, daß die rote Entwicklungsreihe bei jedem Kranken stark zurückgedrängt war, schützten davor hinreichende Unterschiede in der Zellgröße. Anzeichen für eine Ausreifung des pathologischen Markes ergaben sich während der Beobachtungszeit nicht.

Bei den akuten Leukosen wurden 9 Teilungsabläufe von 5 Patienten verfolgt (Tab. 1, s. S. 16) und zum Vergleich 11 Mitoseabläufen von 6 Kontrollpersonen gegenübergestellt (Tab. 2, s. S. 16). Es ergaben sich folgende Durchschnittszeiten für Einzelphasen und Gesamtdauer der Mitosen (siehe auch Abb. 2, S. 17/18) ohne die selten und dann nur teilweise bestimmte Prophase:

	Granulopoese im KM akuter Leukäm.	Granulopoese im KM gesunder Pers.
Metaphase	68,36' +)	49,96' +)
Anaphase	3,57'	3,00'
Telophase	5,23'	4,18'
Rek.-Phase	20,77'	14,45'
Gesamtdauer	97,93'	71,59'

Tab. 3, Erläuterung s. Text

Ana- und Telophase erwiesen sich für den Vergleich am günstigsten, da sie zeitlich sicher abzustecken waren.

Die Zählungen der gefärbten Originalausstriche sind aus Tab. 4 und 5 (s.S. 19), sowie Abb. 3 (s.S. 20) ersichtlich. Der hohe Mitoseindex bei Fall 8 (Tab. 5) stammt von einer Patientin während des finalen Schubes. Der Markausstrich von Fall 6 wies auch in 2000 Zellen keine Mitose auf. - Wurden Patienten trotz des kurzen Krankheitsverlaufes 2 oder gar 3mal punktiert, lieferten die Durchschnittswerte der Zählungen genauere Ergebnisse.

In Tabelle 6 wurden die Phasenprozentzahlen der Originalausstriche (akute Leukämie, Tab. 5) auf 98' Gesamtmitosedauer (ohne Prophase) der Lebendbeobachtung umgerechnet:

+) mit Einschränkung, da abhängig von der Aufnahme der Beobachtung.

	P	f+ sM	A	T	R	Gesamt
Originalaus-striche d. Tab. 5, Mittelwerte	21,43	58,15	14,57	3,00	2,85	in %
Umrechnung auf 98' Lebendbeob-achtung	(27,2')	72,5'	18,1'	3,8'	3,6'	M - R 98,00'
Lebendbeob., Durchschnitts-zeiten (Tab. 3)		68,36'	3,57'	5,23'	20,77'	M - R 98,00

Tab. 6: Vergleich der Einzelphasendauer zwischen karyologischer Kurve und Lebendbeobachtung bei akuten Leukämien.

In Tabelle 7 wurden die Phasenprozentzahlen der Originalausstriche (Kontrollmitosen, Tab. 4) auf 72' Gesamtmitosedauer (ohne Prophase) der Lebendbeobachtung umgerechnet.

	P	f+ sM	A	T	R	Gesamt
Originalaus-striche d. Tab. 4, Mittelwerte	17,50	64,16	12,50	3,50	2,30	in %
Umrechnung auf 72' Lebendbeob-achtung	(15,26')	55,90'	10,90'	3,05'	2,00'	M - R 72,00
Lebendbeob., Durchschnitts-zeiten (Tab. 3)		49,96'	3,00'	4,18'	14,45'	M - R 72,00

Tab. 7: Vergleich der Einzelphasendauer zwischen karyologischer Kurve und Lebendbeobachtung der Kontrollmitosen.

Die Abb. 4 und 5 geben die Werte der letzten beiden Tabellen als vergleichende Kurven wieder (s. S. 21). - In Abb. 6 ist der Teilungsablauf eines leukämischen Blasten kinematographisch festgehalten (s. S. 22).

Fälle	P	fM	sM	A	T	R	Gesamt
L., A.	/	>14'	132'	4'	5'	36'	>191'
	/	>6'	79'	3'	5'	29'	>122'
D., U.	/	/	/	>3'	6'	20'	» 29'
	/	/	>42'	3'	4'	11'	>60'
P., M.	/	/	>42'	3'	7'	16'	>68'
	/	/	/	5'	7'	18'	» 30'
	/	>165'		4'	6'	15'	>190'
W., L.	>3'	71'		>2'	4'	30'	>111'
S., M	/	>64'		3'	3'	12'	>82'

Tab. 1 Mitose(phasen)-Zeiten akuter Leukämiezellen verschiedensten morphologischen Typs.

Kontrollen	P	fM	sM	A	T	R	Gesamt
H., W.	/	/	>30'	2'	3'	9'	>43'
F., P.	/	>93'		4'	5'	21'	>123'
W., W.	/	/	>7'	2'	4'	14'	» 27'
	>6'	22'		2'	4'	17'	>51'
	/	/	>31'	3'	4'	10'	>48'
	/	>65'		6'	7'	18'	>96'
	/	>25'	43'	2'	3'	8'	>81'
D., A.	/	>90'		3'	5'	18'	>116'
	/	/	>49'	2'	4'	19'	>74
S., E.	>10'	27'		3'	>3	14'	>57'
Z., H.	/	>67'		4'	4'	11'	>86

Tab. 2. Mitose(phasen)-Zeiten von Myelo- u. Granuloblasten normaler Kontrollpersonen.

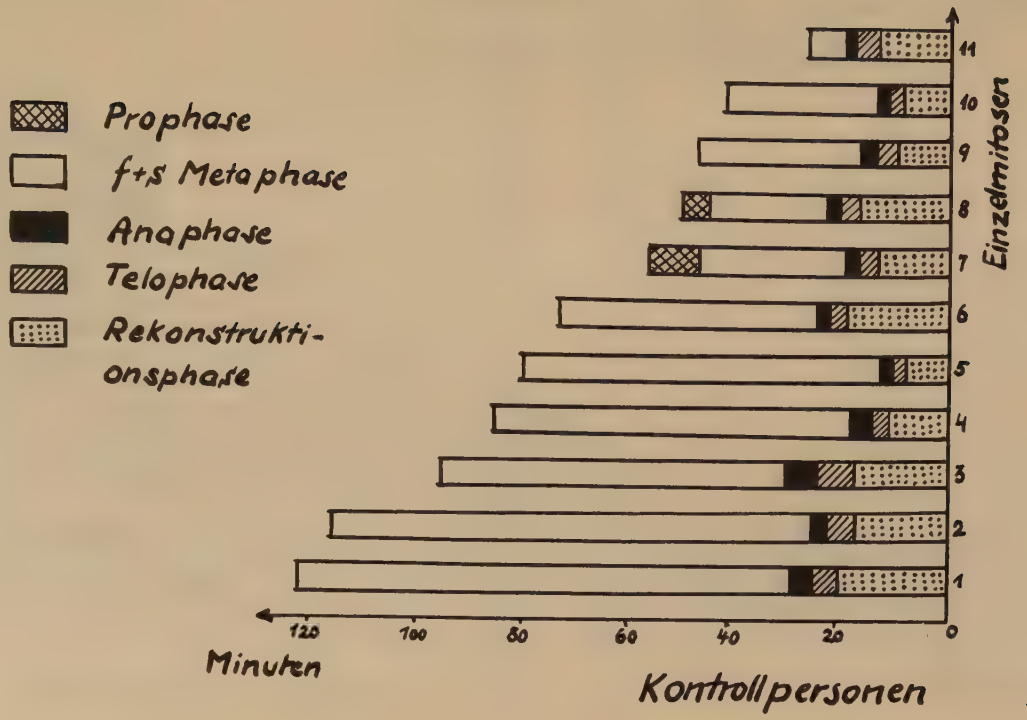
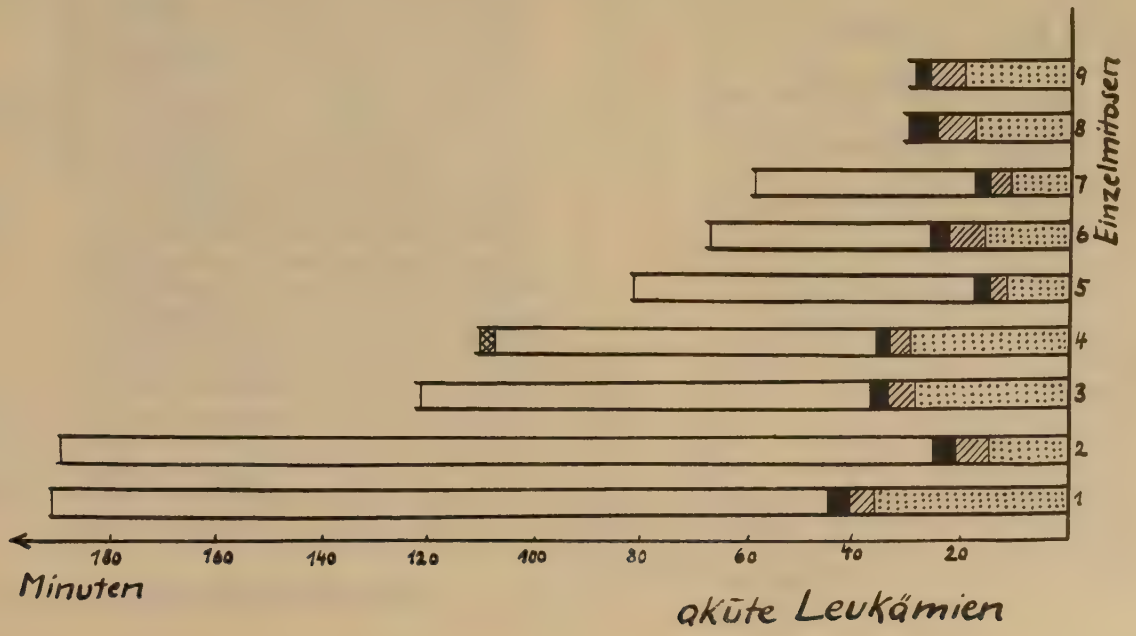

Prophase
f+s Metaphase
Anaphase
Telophase
Rekonstruktionsphase
Einzelmitosen
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
120
100
80
60
40
20
0
Minuten
Kontrollpersonen

Abb. 2 Dauer der beobachteten Mitosephasen i. Sternalmark



	Differenz. Mitosen	Mit. Fnd. ‰	Pro-phase	frühe Metaph.	Späte Metaph.	Ana-phase	Telo phase	Rekonst. phase
Kontroll-pers. 1	100	9	16	31	30	16	5	2
Kontroll-pers 2	100	4	13	30	34	15	4	4
Kontroll-pers. 3	100	8	19	28	35	14	3	1
Kontroll-pers. 4	100	11	18	32	39	8	1	2
Kontroll-pers. 5	100	6	19	32	34	9	4	2
Kontroll-pers. 6	100	8	20	27	33	13	4	3
Gesamt	600	/	105	180	205	75	21	14
Mittelwert	/	7,66	17,5	30,0	34,16	12,5	3,5	2,3

Tab.4 Teilungsfähige Granulopoese-Zellen (Myeloblast-Metamyelocyt) im Sternalmark der gesunden Kontrollpersonen

	Differenz. Mitosen	Mit. Fnd. ‰	Pro phase	frühe Metaph.	Späte Metaph.	Ana-phase	Telo-phase	Rekonstr. phase
Fall 1	100	4	19	41	22	15	1	2
Fall 2	100	2	14	39	22	19	2	4
Fall 3	100	14	8	57	19	11	2	3
Fall 4	100	11	30	28	27	8	3	4
Fall 5	100	5	16	43	13	21	5	2
Fall 6	/	0	/	/	/	/	/	/
Fall 7	100	8	29	23	27	13	5	3
Fall 8	100	23	34	27	19	15	3	2
Gesamt	700	/	150	258	149	102	21	20
Mittelwert	/	8,37	21,43	36,85	21,30	14,57	3,00	2,85

Tab.5. „Blasten", Stammzellen, Promyelocyten (je nach morphologischem Typ) i. Sternalmark akuter Leukämien.

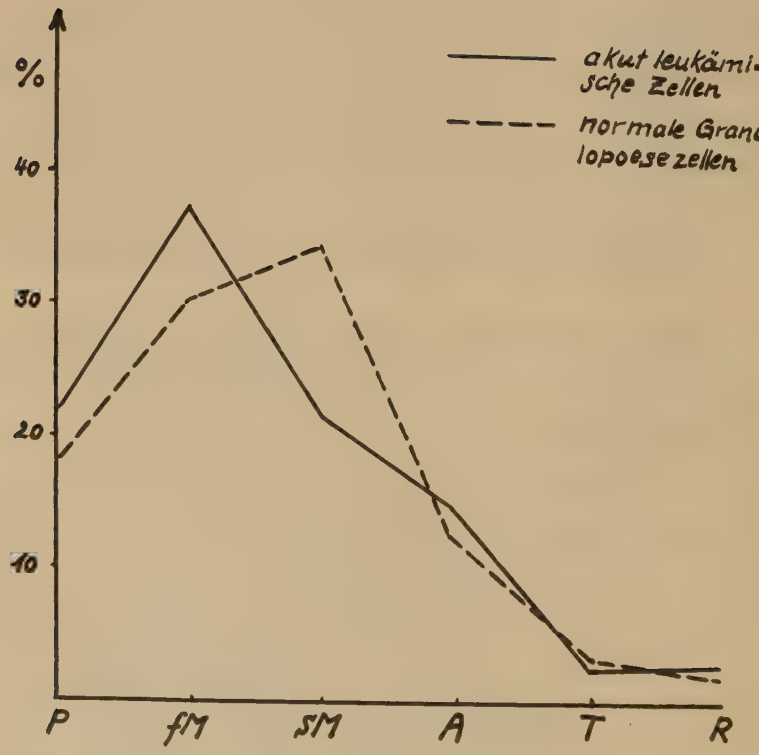
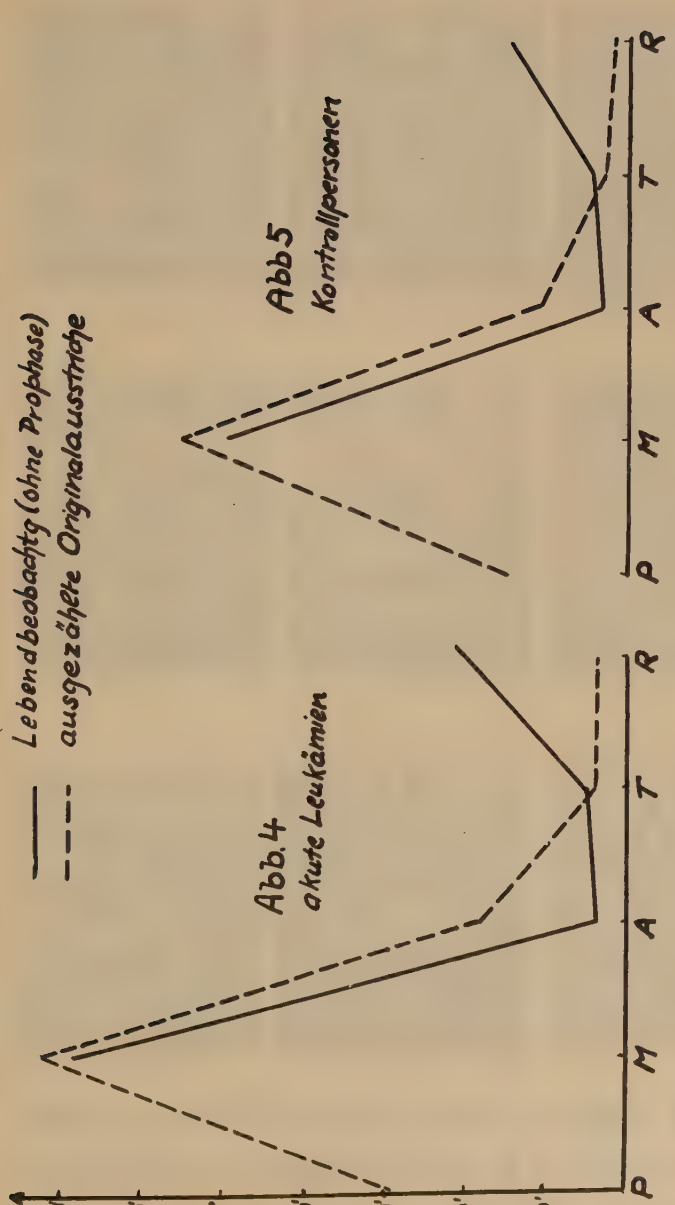


Abb. 3 Vergleichende Phasenprozentverteilung der differenzierten Mitosen der Tabellen 4 u. 5 (Mittelwerte).



Die Abbildungen vergleichen die Einzelphasendauer während der Lebendbeobachtung mit den durch Auszählung der Originalausstriche ermittelten Phasenprozenten (siehe auch Tabelle 6 und 7, Seite 15).

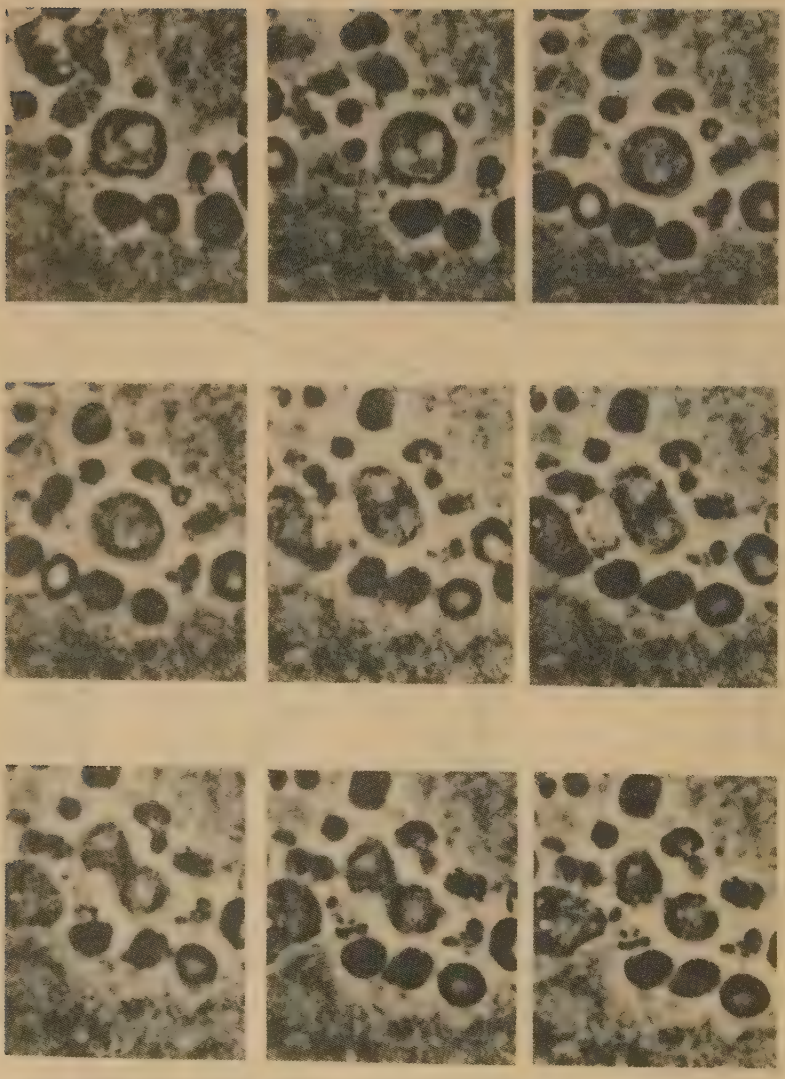


Abb. 6 Mitose eines akūt leukämischen Blasten (SM-T); Aufnahmen im Abstand von ca 3 Minuten.

IV. Diskussion

Die Versuche ergaben eine grundsätzliche Übereinstimmung beider Vergleichsgruppen in Mitosephasenfolge und -ablauf, wofür auch die identischen Teilungsfiguren der gefärbten Ausstriche sprachen.

Bleibt die Prophase unberücksichtigt, stimmt bei den Kontrollen die durchschnittliche Dauer der Granuloblastenteilung mit den Beobachtungen von BOLL, die mit derselben Methode durchgeführt wurden, überein. Ihrem größeren Material entsprechend registrierte sie häufiger Prophasen mit einer Mindestlänge von 15'. Mein um diese Zeitspanne erhöhter Mittelwert läge dann bei 87' und an der oberen Grenze ihrer Messungen.

Es wäre noch zu bedenken, daß nicht erwiesen ist, ob die Proliferationsaktivität in vitro im gleichen Rhythmus wie in vivo stattfindet: die Umweltverhältnisse des Gewebes werden geändert, und Faktoren greifen in die Mitose ein (z.B. das Licht bei der mikroskopischen Beobachtung), die normalerweise wegfallen. Um diesem Fehler zu begegnen, sind Kontrollmitosen, "Leerwerten" entsprechend, zum Vergleich zweckmäßig. Unsere mittlere Mitosezeit der pathologischen Blasten verhält sich mit 98' zu der der normalen Granuloblasten mit 72' unter völlig gleichen Versuchsbedingungen wie 4 : 3.

In der Literatur sind sonst nur noch von RONDANELLI und BUSSI Lebendbeobachtungen an menschlichen Knochenmarkzellen beschrieben. RONDANELLI gibt eine Gesamtdauer von 112'49" an (P 21' 30", f und sM 65'16", A 14'42", T 11'21"), die damit deutlich höher liegt. Er erwähnt übrigens die gleichen Schwierigkeiten, die Prophase genau zu begrenzen. BUSSIs Mittelwert von ca 75' bleibt nur wenig unterhalb unserer Gesamtdauer.

Bei der Bearbeitung dieses Abschnittes geht vom gerade beendeten 8. Kongr. Europ. Ges. Haematol., Wien 1961, ein Diskussionsbeitrag

ASTALDIs über bisher unveröffentlichte Untersuchungen zur funktionellen Cytologie akuter Leukosen ein. Er berichtet darin ebenfalls von Lebendbeobachtungen im Phasenkontrastmikroskop und beziffert die Mitosedauer seiner pathologischen Blasten mit 193'13" (P 42'12", f und sM 88'17", A 28'18", T 35'26") erheblich höher; die Phasenzeiten stimmen mit unseren etwa überein. Absolute Zeitangaben hängen aber sehr von der angewandten Methode ab, deren detaillierte Schilderung sehr von Nutzen gewesen wäre. Da er selbst auch keine Kontrollfälle als Maßstab gegenüberstellte, mußte er sich notgedrungen auf die Vermutung beschränken: "this is certainly no shorter than the normal". (Vergleichend könnten nur die Normalwerte von RONDANELLI herangezogen werden, die vermutlich unter gleichen Versuchsbedingungen erhalten wurden). Leider gibt ASTALDI auch nicht an, wieviel Patienten bzw. verfolgte Einzelmitosen diese Durchschnittszeit stützen.

Abgesehen von Unterschieden in der Beurteilung der Phasenabgrenzung müßten also, um direkte Vergleiche zwischen ASTALDI, RONDANELLI und uns zu ziehen, Versuchsanordnung und Kulturmethode genau koordiniert werden, zumal noch eine erhebliche biologische Schwankungsbreite der einzelnen Mitoselänge hinzukommt.

Vergleicht man unter Vorbehalt (wie oben ausgeführt) die Blastenmitosen ASTALDIs mit den allein in Frage kommenden Normalwerten von RONDANELLI, so ergibt sich bei absolut höheren Zahlen eine noch etwas krassere Verlängerung gegenüber der Norm. Unter diesen eingeschränkten Voraussetzungen können seine Beobachtungen unsere Ergebnisse nur stützen.

Es soll nicht verschwiegen werden, wie problematisch es ist, sich nicht voll entsprechende Zellelemente zu vergleichen. SALERA und TAMBURINO weisen ebenfalls darauf hin, konnten aber auf eine Gegenüberstellung ebensowenig verzichten, um überhaupt eine Aussage zu machen. Die Knochenmarkzellen der akuten Leukämie sind so entdifferenziert, daß sie auch dem normalen Zelltyp des Myeloblasten nicht voll entspre-

chen. Die hier verfolgten Zellen teilten sich in Mikroblasten-, Parablasten- und Promyelocyten-artige Elemente auf. Alle zeigten vielfache Zeichen ihrer Unreife: große Nucleolen, perinucleäre Anhäufung des Chromatins, Verschiebung des Kern-Plasma-Verhältnisses, eingebuchtete Kerne, AUER-Stäbchen u.v.m.; in manchen Präparaten boten sie unregelmäßige Wanderformen (RIND bestätigt diese Befunde). BRAUNSTEINER und FELLINGER glauben aber, kein definitives Charakteristikum einer Leukämiezelle finden zu können, zumal die Morphologie praktisch von Patient zu Patient schwankt. Die Zellen wurden, da keine genügende Anzahl normaler Myeloblasten-Mitosen aufzufinden war und die Vergleichbarkeit, wie eben dargelegt, ohnehin eingeschränkt ist, den Mitosen der ganzen gesunden Granulopoese (Myeloblast bis Myelocyt) gegenübergestellt.

ASTALDI wies, wie auch wir beobachteten, auf die besonders kompakten Chromosomenformen hin und erwähnte häufiger aberrierende Chromosomen; das letzte konnten unsere Untersuchungen jedoch nicht bestätigen.

Im Gegensatz zur Lebendbeobachtung liegen noch Berechnungen aus fixierten Präparaten über die Mitosedauer vor. SALERA und TAMBURINO fanden mit Hilfe des stathmokinetischen Testes eine Länge von 52'46" ($\pm$ 30'15"). Diese sehr kurze Zeit beruht einmal auf dem niedrigen Mitoseindex ihrer Patienten: 1,9‰ $\pm$ 0,4, zum anderen ist, wie ASTALDI selbst zugibt, seine Versuchsanordnung wenig geeignet, bindende Rückschlüsse auf die Mitosedauer zu erhalten, da die Wirkung des Colchicins auf die Proliferation nicht restlos geklärt ist, und somit der benutzte Index Fehler enthalten kann. Dafür sprechen auch die kürzlich von BOLL und FUCHS mitgeteilten Berechnungen über die Zellreifung.

Die von uns ausgezählten Mitoseindices der akuten Leukämien (Tab. 5) von 8,37‰ (0 - 23‰) entsprechen in der Literatur den Anga-

ben von ROHR und denen von BEGEMANN und HEMMERLE, die ähnlich große Schwankungen, nämlich zwischen 0,2 und 25,5‰, fanden. ASTALDI und MAURI (1,64‰) sowie SALERA und TAMBURINO, 2,7 (±0,64)‰, zählten niedrigere Indices.

Die übereinanderprojizierten karyologischen Kurven der pathologischen und normalen Granuloblasten (Abb. 3) zeigen verschiedene Gipfel, da zahlenmäßig am stärksten in den Leukämie-Ausstrichen die frühen Metaphasen, in den Kontrollfällen die späten Metaphasen vertreten waren. Daraus ergibt sich eine charakteristische Parallelverschiebung in diesem Bereich bei den pathologischen Blasten nach links (Dissertation SCHULZ).

In den Abbildungen 4 und 5 werden die Phasenzeiten der Lebendbeobachtung mit den entsprechend umgerechneten Phasenprozentzahlen der Originalausstriche verglichen. Während frühe und späte Metaphase sowie Telophase nahezu identisch sind, liegt die Anaphase im fixierten Präparat höher als die Telophase; unter der Beobachtung wurde die Telophase jedoch stets etwas länger gemessen. Das dürfte darauf beruhen, daß unser Auge nicht fein genug ist, die bereits vollzogene Trennung der anfangs noch beieinander liegenden Chromosomensätze rechtzeitig zu erkennen. Im fixierten Präparat ist dies durch die Färbung, stärkere Vergrößerung und das wohl mechanische Auseinanderreißen der Chromosomensätze beim Ausstreichen besser möglich (s. auch Abb. 1a - 1c). Zweitens ist bei der Rekonstruktionsphase der fehlende Kurvenanstieg in den Originalausstrichen auffällig. BOLL vermutet in der Kultur eine gewisse Verzögerung bis zur Wiederherstellung der Tochterzellen, wofür auch das oft persistierende Plasmafädchen spreche. Wahrscheinlich nimmt außerdem das Auge ohne Hilfe der Färbung die Rekonstruktion etwas verzögert wahr. SCHULZ argumentiert von der entgegengesetzten Seite und führt die spärliche Zahl der Rekonstruktionsphasen im fixierten Präparat darauf zurück, daß bei der Markgewinnung und während des Ausstreichens benachbarte Tochterzellen auseinandergerissen werden und dann als Prophasen erscheinen, womit sich deren Anteil erhöht. Aus diesem

und noch anderen von BEGEMANN und HEMMERLE aufgeführten Gründen können die karyologischen Kurven FIESCHIs kein getreues Abbild der Dauer der Einzelphasen zueinander sein: die Knochenmarkzellen träten nicht kontinuierlich (in gleichbleibenden zeitlichen Abständen) in Mitose, sondern ihre Teilungsintensität schwanke; sie beweisen, daß sich dann die ausgezählten Einzelphasen prozentual zueinander ändern können, auch wenn die Länge der Gesamtteilung gleichbleibt. - Schon v. MOELLENDORFF machte 1938 die Erfahrung, daß die durch Auszählung gewonnenen Kurven sich nicht mit denen deckten, die er nach kinematographischer Messung an Einzelzellen aufstellte. Für die hier aufgegebene Fragestellung gebührt daher u. E. der Lebendbeobachtung der Vorrang, denn nur sie kann durch ihre Methode die Proliferationsschwankungen des Gewebes umgehen und vor allem die von Zellteilung zu Zellteilung variierende Gesamtlänge der Mitose erfassen.

V. Zusammenfassung

Sternalmarkkulturen von 8 Kranken mit akuter Leukämie und 6 gesunden Personen wurden phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Dabei konnte eine Anzahl Mitoseabläufe sowohl der pathologischen Blasten als auch der normalen Myelo- und Granuloblasten zeitlich gestoppt werden. Beide Versuchsreihen wurden verglichen: die akut leukämischen Zellen durchliefen die einzelnen Teilungsphasen (soweit gemessen) in deutlich längerer Zeit. Ihre Gesamtmitosedauer verhielt sich gegenüber den Zellen der normalen Granulopoese im Durchschnitt wie 4 : 3. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde anderer Autoren, erhalten mit dem stathmokinetischen Test und der Cytoautoradiographie und widersprechen der landläufigen Meinung, daß bei dieser Blutkrankheit eine übersteigerte Proliferation bei normalem Mitoseindex mit zwangsläufig verkürzter Mitose im Knochenmark vorliege.

VI. Literaturverzeichnis

ASTALDI, G. u. C. MAURI: La valutazione dell'attività proliferativa delle cellule midollari.
Studio di un "Test Statmocinetico"
Haematologica, Estratto dal Vol XXXIII, 13 (1949)

ASTALDI, G. u. C. MAURI: La durata della mitosi delle cellule ematopoitiche.
Studio di un "Test Cronomitotico"
Haematologica, Estratto dal Vol XXXVII, 9 (1953)

ASTALDI, G. u. C. MAURI: Recherches sur l'activité proliferative de l'hémocytoblaste de la leucémie aigue.
Revue Belge de Pathologie Vol XXIII, 2, 71 (1953)

ASTALDI, G.: Functional Cytologie in Leukemia - with Reference to Proliferating Activity.
VIII. Kongr. Europ. Ges. Haematol., Wien 1961
(Vortragsmanuskript)

BEGEMANN, H. u. W. HEMMERLE: Die Mitosetätigkeit des menschlichen Knochenmarks und ihre Beeinflussung durch cytostatische Substanzen.
Klin. Wschr. 27, 531 (1949)

BOLL, I.: Mitosebeeinflussung von menschlichen Knochenmarkzellen in vitro.
Ausstellung VII. internat. Hämatologen Kongreß Rom 1958

BOLL, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. - Granuloblastenmitosen.
Folia haem., Neue Folge 3, 58 (1959)

BOLL, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. - Entstehung von zweikernigen Zellen.
Folia haem., Neue Folge 3, 84 (1959)

BOLL, I. u. G. FUCHS: Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro.
Blut 7, 257 (1961)

BRAUNSTEINER, H. u. K. FELLINGER: Die Phasenkontrastmikroskopie in der Haematologie.
Handb. d. ges. Haematologie, Urban-Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, Bd. II, 2. Halbbd. 23 (1960)

BUSSI, L.: Ital. Haematol. Kongreß Rom
Bericht Ste. 152 (1953)

FIESCHI, A.: Studio della funzionalità mieloide.
Mielogramma e curve di maturazione, quoziente cariocinetico e analisi del ritmo cariocinetico in base curve alle cariologiche.
Haematologica 19, 539 (1938)

FIESCHI, A.: Semiologie des Knochenmarkes.
Erg. d. Inn. Med. u. Kinderheilkde. 59, 396 (1941)

FLIEDNER, T. M., E. P. CRONKITE u. V. P. BOND: Die Proliferationsdynamik der Blutzellbildung, autoradiographisch untersucht mit tritiummarkiertem Thymidin.
Schw. Med. Wschr. 89, 41, 1061 (1959)

GAVOSTO, F., G. MARAINI u. A. PILERI. Proliferative Capacity of Acute Leukaemia Cells.
Nature, Vol 187, 4737, 611 (1960)

GAVOSTO, F., G. MARAINI u. A. PILERI: Nucleic Acids and Protein Metabolism in Acute Leukaemia Cells.
Blood 16, 1555 (1960)

HEILMEYER, L. u. H. BEGEMANN: Handb. d. Inn. Med. 4. Aufl., 2. Bd., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 49 (1951)

LAJTHA, L. G., R. OLIVER u. F. ELLIS: Incorporation of P^{32} and Adenine C^{14} into DNA by Human Bone Marrow Cells in vitro.
Brit. J. Cancer 8, 367 (1954)

v. MOELLENDORFF, W.: Zur Kenntnis der Mitose.
Arch. exper. Zellforschg. 21, 1 (1937)

v. MOELLENDORFF, W.: Zur Kenntnis der Mitose II.
Z. Zellforschg. 27, 301 (1938)

RIND, H.: Atlas der Phasenkontrasthaematologie.
Akademie-Verlag Berlin 210 (1958)

ROHR, K.: Das menschliche Knochenmark.
Thieme-Verlag, Stuttgart, 3. Aufl., 99 (1960)

RONDANELLI, E. G., P. GORINI, E. STROSSELLI u. V. MONESI:
Significato funzionale dell'ambeboidismo mitotico.
Ricerche sulle cellule degli organi emopoietici coltivato in vitro.
Estratto dal Boll. Soc. Med. Chirurg. Pavia 71, 3/4 (1957)

RONDANELLI, E. G. u. E. STROSSELLI: Ricerche sul fenomeno della binuclearìatà nelle cellule emopoietiche. Documentazione microcinematografica di una nuova particulare modalità nella formazione di una cellula a due nuclei.
Haematologica Vol XLII, 1601 (1957)

RONDANELLI, E. G., P. GORINI u. D. PECORARI: Influence of differentiation and maturation upon the time cycle of mitosis in normal hemopoietic cells cultivated in vitro.
VII. Congr. d. Soc. Intern. di Ematologia, Roma 7 - 13 Settembre 1958

SALERA, U. u. G. TAMBURINO: Studio dell'attività proliferativa delle cellule leucemiche - Leucemia acute.
Estratto da "Atti del Congresso Nazionale della Lega Italiana per la lotta contro i tumori"
Trieste 28 - 29 Giugno 1953

SALERA, U. u. G. TAMBURINO: Die Proliferation der leukämischen Zellen. Quantitative Untersuchung der Karyokinese und der Durchschnittsdauer der Mitose.
Sci. med. ital., Dtsch. Ausg. 4, 447 (1956)

SALERA, U. u. G. TAMBURINO: Etude sur l'activité prolifératives des cellules leucémiques.
Sang 26, 216 (1955)

SCHULZ, R. D.: Mitoseindex und Mitosephasenverteilung im Knochenmark bei akuter Leukämie.
Inauguraldissertation (noch nicht veröffentlicht)
Aus der I. Inn. Abt. d. Städt. Krkhs. Neukölln, ärztl. Direktor: Prof. Dr. K. Holldack, Berlin

TAMBURINO, G., P. MAGNANELLI u. U. SALERA: Sintesi dell' ADN e attività proliférativa delle cellule mieloidi. II. Ricerche citoautoradiografiche mediante impriego di P^{32} sui granuloblasti midollari, normali e leucemici.
Estratto dal "Boll. Oncol. (della Lega Italiana per la lotta contro i Tumori)" Vol XXXI, 5 (1957)

WEICKER, H.: Zellteilung und Zellteilungsstörungen.
Handb. d. ges. Haematologie,
Urban-Schwarzenberg, München-Berlin-Wien
148 (1957)

Frau Oberarzt Dr. med. Irene B o l l, Städt. Krankenhaus Berlin - Neukölln, hat mich in die Methodik der Phasenkontrastmikroskopie eingeführt und diese Arbeit mit wertvollen Anregungen gefördert; ich möchte ihr dafür herzlich danken.

Lebenslauf

Ich wurde am 8. März 1935 in Eberswalde (Brandenburg) geboren und bin evangelischer Konfession. Mit Ausbruch des Krieges verzogen wir nach Schweidnitz in Schlesien, wo ich im Jahre 1941 eingeschult wurde.

Nach dem Zusammenbruch beendete ich meine Grundschuljahre in Ausleben Kreis Oschersleben. Seit 1946 war ich nacheinander Schüler der Gymnasien in Hamburg-Bergedorf, Hann.-Münden und Freiburg i. Breisgau. Dort bestand ich im Frühjahr 1955 das Abiturium am Kepler-Gymnasium. Im Sommersemester des gleichen Jahres begann ich das Studium der Humanmedizin in Freiburg i. Br., wechselte zur Universität Kiel über und bestand dort nach 5 vorklinischen Semestern das Physikum. Nach 6 weiteren klinischen Fachsemestern an der Freien Universität Berlin habe ich hier im April 1961 die ärztliche Prüfung abgelegt.

Zur Zeit bin ich als Medizinalassistent tätig.

Photodruck der Photo Copie GmbH.